



دانشگاه علوم پزشکی  
و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

دانشکده پزشکی

پایان نامه مقطع کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی

عنوان

مطالعه‌ای بر تشخیص عناصر قارچی با روش‌های مورفولوژیک و مولکولی در  
نمونه‌های خلط بیماران مسلول مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل استان سیستان و  
بلوچستان در سال ۱۳۹۷

توسط

حمیدرضا ابراهیمی‌فر

اساتید راهنما

دکتر سید امین آیت اللهی موسوی | دکتر علیرضا سلیمی خراشاد

استاد مشاور

دکتر علیرضا داشی‌پور

سال تحصیلی (تیر ۹۹)

شماره پایان نامه: (۵۶۱)



دانشگاه علوم پزشکی کرمان  
تحصیلات تکمیلی دانشگاه

بسمه تعالی

صور تجلسه دفاع از پایان نامه

تاریخ: ۹۹/۳/۳۰

شماره: ۹۹/۳/۵۸۱

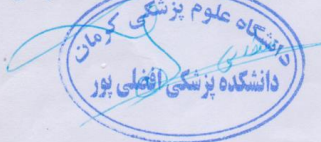
کد اخلاق: .....

جلسه دفاعیه پایان نامه آقای حمید رضا ابراهیمی فر کارشناسی ارشد رشته قارچ شناسی پزشکی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان "مطالعه ای بر شناسایی عناصر قارچی با روش های مورفولوژیک و مولکولی در نمونه های خلط بیماران مسلول مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل استان سیستان و بلوچستان در سال ۱۳۹۷" در ساعت ۱۰ روز دوشنبه مورخ ۹۹/۴/۳۰ با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

سمت	نام و نام خانوادگی	امضا
الف: استاد راهنما (اول)	جناب آقای دکتر سید امین آیت الهی موسوی	
ب: استاد راهنما (دوم)	جناب آقای دکتر علیرضا سلیمی خراشاد	
ج: استاد مشاور	جناب آقای دکتر علیرضا داشی پور	
د: استاد مشاور (دوم)	.....	
د: عضو هیات داوران (داخلی)	سرکار خانم دکتر ستاره آقا کوچک افشاری	
د: عضو هیات داوران (خارجی)	جناب آقای دکتر مهدی رضائی فر	
ر: نماینده تحصیلات تکمیلی	جناب آقای دکتر پویا قاسمی نژاد	

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی به شرح پیوست با درجه ..... عالی ..... و نمره ..... ۱۹۷ ..... مورد تأیید قرار گرفت.

مهر و امضاء معاون آموزشی



## فهرست مندرجات

صفحه

عنوان

ح	فهرست جداول
ط	فهرست شکل‌ها
ل	فهرست کوتاه نوشته‌ها
	چکیده

### فصل اول: مقدمه و اهداف

Error! Bookmark not defined.	۱-۱ مقدمه
Error! Bookmark not defined.	۱-۲ اهداف
Error! Bookmark not defined.	۱-۲-۱ هدف کلی طرح
Error! Bookmark not defined.	۱-۲-۲ اهداف فرعی طرح
Error! Bookmark not defined.	۱-۲-۳ اهداف کاربردی طرح
Error! Bookmark not defined.	۱-۲-۴ سؤالات پژوهش (با توجه به اهداف فرعی طرح):

### فصل دوم: کلیات و مروری بر مطالعات انجام شده (بررسی متون)

Error! Bookmark not defined.	۲-۱ خصوصیات کلی قارچ‌ها
Error! Bookmark not defined.	۲-۲ قارچ‌های احشایی و فرصت طلب
Error! Bookmark not defined.	۲-۳ قارچ‌های پاتوژن حقیقی
Error! Bookmark not defined.	۲-۴ قارچ‌های فرصت طلب
Error! Bookmark not defined.	۲-۵ کاندیدیازیس
Error! Bookmark not defined.	۲-۵-۱ مروری بر کاندیدیازیس و تشخیص آزمایشگاهی آن
Error! Bookmark not defined.	۲-۵-۲ تاکسونومی کاندیدا
Error! Bookmark not defined.	۲-۵-۳ ویژگی‌های قارچ شناسی کاندیدا

۱-۳-۵-۲ مورفولوژی: ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۳-۵-۲ فیزیولوژی: ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۳-۵-۲ دیواره سلولی کاندیدا: ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۵-۲ فاکتورهای موثر در ابتلا به کاندیدیازیس ..... Error! Bookmark not defined.

۱-۴-۵-۲ فاکتورهای بیماریزایی وابسته به میزبان ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۴-۵-۲ فاکتورهای بیماریزایی وابسته به محیط ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۴-۵-۲ فاکتورهای بیماریزایی وابسته به جنس کاندیدا ..... Error! Bookmark not defined.

۵-۵-۲ گونه های کاندیدا ..... Error! Bookmark not defined.

۱-۵-۵-۲ کاندیدا آلبیکنس ..... Error! Bookmark not defined.

۲-۵-۵-۲ کاندیدا تروپیکالیس ..... Error! Bookmark not defined.

۳-۵-۵-۲ کاندیدا کروزه ای ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۵-۵-۲ کاندیدا گلابراتا ..... Error! Bookmark not defined.

۵-۵-۵-۲ کاندیدا کفایر ..... Error! Bookmark not defined.

۶-۵-۵-۲ کاندیدا پاراپسیلوزیس ..... Error! Bookmark not defined.

۷-۵-۵-۲ کاندیدا لوزیتانیا ..... Error! Bookmark not defined.

۸-۵-۵-۲ کاندیدا گیلرموندی ..... Error! Bookmark not defined.

۶-۵-۵-۲ اشکال بالینی ..... Error! Bookmark not defined.

۷-۵-۵-۲ کاندیدیازیس ریوی ..... Error! Bookmark not defined.

۸-۵-۵-۲ پیش آگهی ..... Error! Bookmark not defined.

۹-۵-۵-۲ درمان عفونت کاندیدیازیس ..... Error! Bookmark not defined.

۶-۲-۲ تشخیص آزمایشگاهی ..... Error! Bookmark not defined.

۱-۶-۲ آزمایش مستقیم ..... Error! Bookmark not defined.

Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۲ کشت  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۳ تعیین هویت مخمرها  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۴ تولید لوله زایا  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۵ ایجاد کلامیدوسپور  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۶ مشخصات بیوشیمیایی  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۷ تشخیص سرولوژیک  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۸ تستهای رادیوگرافی و تصویر برداری  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۹ تشخیص مولکولی  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۱۰ واکنش زنجیره ای پلی مرز (PCR):  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۱۱ تعیین توالی (Sequencing):  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۶-۱۲ ختم زنجیر سازی:  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷ آسپرژیلوزیس  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷-۱ عوامل و انتشار بیماری  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷-۲ آزمایش مستقیم  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷-۳ روش های رنگ آمیزی و هیستوپاتولوژیک  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷-۴ روش های ایمنو هیستوشیمی  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷-۵ کشت  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷-۶ روش های سرولوژیک مبتنی بر تشخیص آنتی ژن  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷-۷ روش های سرولوژیک مبتنی بر تشخیص آنتی بادی  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷-۸ سنجش متابولیت ها  
 Error! Bookmark not defined. .... ۲-۷-۹ تست های تشخیصی مبتنی بر واکنش زنجیره ای پلی مرز

defined.

۱-۹-۷-۲. روش های تشخیص مولکولی برای شناسایی قارچ ها **Error! Bookmark not defined.**

**defined.**

۸-۲ مطالعات پیشین **Error! Bookmark not defined.**

## فصل سوم: مواد و روش ها

۱-۳ نوع مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۲-۳ جامعه مورد مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۳-۳ منطقه مورد مطالعه **Error! Bookmark not defined.**

۴-۳ معیارهای ورود به طرح **Error! Bookmark not defined.**

۵-۳ معیارهای خروج از طرح **Error! Bookmark not defined.**

۶-۳ حجم نمونه **Error! Bookmark not defined.**

۷-۳ روش اجرای طرح **Error! Bookmark not defined.**

۸-۳ مواد و تجهیزات مورد نیاز **Error! Bookmark not defined.**

۹-۳ روش بررسی میکروسکوپی با استفاده از شفاف سازی **Error! Bookmark not defined.**

۱۰-۳ تهیه محیط کشت **Error! Bookmark not defined.**

۱-۱۰-۳ سابورو دکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل (Sabouraud Dextrose Agar)

(chloramphenicol) **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۰-۳ محیط کشت کروم آگار (CHROM agar) **Error! Bookmark not defined.**

۳-۱۰-۳ محیط کشت چاپک داکس آگار (CZAPEK-DOX-AGAR) **Error! Bookmark not defined.**

**defined.**

۱۱-۳ استخراج DNA **Error! Bookmark not defined.**

۱-۱۱-۳ آماده سازی مواد برای استخراج DNA **Error! Bookmark not defined.**

۲-۱۱-۳ مراحل انجام کار جهت استخراج DNA **Error! Bookmark not defined.**

۱۲-۳ انجام Nested PCR جهت تعیین عفونت قارچی و جنس و گونه های کاندیدا آلبیکنس و آسپرژیلوس

فومیگاتوس ..... Error! Bookmark not defined.

۱۲-۳-۱ پرایمرها ( الیگو نوکلئوتیدها) ..... Error! Bookmark not defined.

۱۲-۲-۲ آماده کردن مخلوط برای انجام Nested-PCR ..... Error! Bookmark not defined.

۱۲-۳-۳ انجام تکنیک Nested-PCR ..... Error! Bookmark not defined.

۱۲-۴-۳ روش انجام PCR ..... Error! Bookmark not defined.

۱۳-۳ طرز تهیه بافر TBE ..... Error! Bookmark not defined.

۱۴-۳ طرز تهیه ژل آگارز ..... Error! Bookmark not defined.

۱۵-۳ الکتروفورز محصول PCR بر روی ژل آگارز ..... Error! Bookmark not defined.

۱۶-۳ مراحل الکتروفورز محصول PCR ..... Error! Bookmark not defined.

۱۷-۳ توالی یابی ژنوم (Sequencing) ..... Error! Bookmark not defined.

۱۸-۳ انتقال اطلاعات به کامپیوتر و آنالیز بیوانفورماتیک و تعیین توالی محصولات PCR ..... Error!

**Bookmark not defined.**

۱۹-۳ روش تحلیل و توصیف داده ها ..... Error! Bookmark not defined.

۲۰-۳ ملاحظات اخلاقی ..... Error! Bookmark not defined.

۲۱-۳ محدودیت های اجرائی مطالعه ..... Error! Bookmark not defined.

۲۲-۳ کد و تاریخ مجوز کمیته اخلاق ..... Error! Bookmark not defined.

## فصل چهارم: نتایج

۴-۱ اطلاعات دموگرافیک افراد در مطالعه حاضر ..... Error! Bookmark not defined.

۴-۲ تعیین موارد مثبت با استفاده از بررسی میکروسکوپی، کشت، Nested-PCR و Sequencing جهت

تشخیص عفونت های قارچی و گونه های آلبیکنس و فومیگاتوس بترتیب از جنس های کاندیدا و آسپرژیلوس

در بیماران مبتلا به سل ..... Error! Bookmark not defined.

**Error! Bookmark not defined.** ..... ۴-۲-۱ روش میکروسکوپی

**Error! Bookmark not defined.** ..... ۴-۲-۲ کشت

**Error! Bookmark not defined.** ..... Nested-PCR ۴-۲-۳

**Error! Bookmark not defined.** ..... (Sequencing) ۴-۲-۴ تعیین توالی

۴-۳ بررسی فاکتورهای دموگرافیک با توجه به موارد مثبت با استفاده از روش Nested-PCR ، روش

**Error! Bookmark not defined.** ..... میکروسکوپی و کشت در جمعیت تحت مطالعه

۴-۴ مقایسه روش‌های تشخیصی کشت، میکروسکوپی و Nested-PCR جهت تشخیص عفونت‌های قارچی

**Error! Bookmark not defined.** .....

۴-۵ ضریب کاپا، حساسیت و ویژگی و ارزش اخباری روش میکروسکوپی و کشت در مقایسه با Nested-PCR

**Error! Bookmark not defined.** ..... جهت تشخیص عفونت‌های قارچی در بیماران مبتلا به سل

## فصل پنجم: بحث و نتیجه‌گیری

**Error! Bookmark not defined.** ..... ۵-۱ بحث:

**Error! Bookmark not defined.** ..... ۵-۲ نتیجه‌گیری

۱۵ ..... منابع

**Error! Bookmark not defined.** ..... پیوست‌ها.



## فهرست جداول

عنوان

صفحه

جدول ۱-۳: لیست مواد استفاده شده در مطالعه ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۲-۳: لیست دستگاه هایی که در مطالعه بکارگرفته شدند ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۳-۳: پرایمرها برای انجام Nested-PCR جهت تعیین عفونت قارچی و گونه های آلبیکنس و

فومیگاتوس به ترتیب از جنس های کاندیدا و آسپرژیلوس ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۳-۴: معرف های مورد نیاز برای انجام مرحله اول PCR ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۳-۵: معرف های مورد نیاز برای انجام مرحله دوم PCR ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۳-۶: طرز تهیه ژل آگارز براساس سائز باند محصولات ناشی از PCR **Error! Bookmark not defined.**

**defined.**

جدول ۱-۴: توزیع فراوانی موارد مثبت با استفاده از روش Nested-PCR، در مسلولین مراجعه کننده به

آزمایشگاه مرجع سل استان سیستان و بلوچستان، شهر زاهدان در سال ۹۷-۹۸ **Error! Bookmark not defined.**

**defined.**

جدول ۴-۲: مقایسه روش های تشخیصی کشت، میکروسکوپی و Nested-PCR جهت تشخیص عفونت

های قارچی در مسلولین مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل استان سیستان و بلوچستان، شهر زاهدان در

سال ۹۷-۹۸ ..... **Error! Bookmark not defined.**

جدول ۴-۳: ضریب کاپا، حساسیت و ویژگی و ارزش اخباری روش میکروسکوپی و کشت در مقایسه با

Nested-PCR جهت تشخیص عفونت قارچی در مسلولین مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل استان

سیستان و بلوچستان، شهر زاهدان در سال ۹۷-۹۸ ..... **Error! Bookmark not defined.**

## فهرست شکل‌ها

صفحه

عنوان

شکل ۱-۲: نمای شماتیک از یک مرحله PCR. Error! Bookmark not defined.

شکل ۲-۲: نمای شماتیک از یک مرحله Sequencing. Error! Bookmark not defined.

شکل ۲-۳: نمای شماتیک واکنش طی تست گالاکتومانان به روش الیزا. Error! Bookmark not defined.

شکل ۱-۳: منطقه مورد مطالعه، شهر زاهدان، استان سیستان و بلوچستان. Error! Bookmark not defined.

شکل ۲-۳: تمایز رنگی گونه‌های مختلف کاندیدا بر روی محیط کرم آگار. Error! Bookmark not defined.

شکل ۳-۳: کیت استخراج DNA. Error! Bookmark not defined.

شکل ۱-۴: نمودار توزیع فراوانی جنسیت در مسلولین مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل استان سیستان

و بلوچستان، شهر زاهدان در سال ۹۷-۹۸. Error! Bookmark not defined.

شکل ۲-۴: نمودار توزیع فراوانی محل سکونت مسلولین مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل استان سیستان

و بلوچستان، شهر زاهدان در سال ۹۷-۹۸. Error! Bookmark not defined.

شکل ۳-۴: نمودار توزیع فراوانی بر حسب شغل مسلولین مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل استان

سیستان و بلوچستان، شهر زاهدان در سال ۹۷-۹۸. Error! Bookmark not defined.

شکل ۴-۴: نمودار توزیع فراوانی موارد مثبت با استفاده از روش‌های تشخیص میکروسکوپی، کشت و

Nested-PCR مسلولین مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل استان سیستان و بلوچستان، شهر زاهدان در

سال ۹۷-۹۸. Error! Bookmark not defined.

شکل ۴-۵: کاندیدا در بررسی میکروسکوپی با استفاده از پتاس. Error! Bookmark not defined.

شکل ۴-۶: فارچ ساپروفیت در بررسی میکروسکوپی با استفاده از پتاس. Error! Bookmark not defined.

شکل ۴-۷: کلنی‌های کاندیدا آلبیکنس در محیط کشت کرم آگار. Error! Bookmark not defined.

شکل ۴-۸: کلنی‌های آسپرژیلوس نیجر در محیط کشت چاپک داکس آگار. Error! Bookmark not defined.

defined.

شکل ۹-۴: نمایش محصول Nested-PCR برای تشخیص عفونت قارچی با استفاده از پرایمرهای

PamFungal. لاین 1 مارکر 100 bp، لاین ۲ تا ۱۰ نمونه مثبت باند 744 bp. **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۱۰-۴: نمایش محصول Nested-PCR برای تشخیص گونه ی آلبیکنس از جنس کاندیدا با استفاده از

پرایمرهای PamFungal. لاین 1 مارکر 100 bp، لاین ۲، ۳، ۷، ۹ و ۱۰ نمونه منفی، لاین ۴، ۵، ۶ و ۸ نمونه مثبت

باند 520 bp. **Error! Bookmark not defined.**

شکل ۱۱-۴: آنالیز فیلوژنیکی توالی های گونه های قارچی با استفاده از نرم افزار Chromas. .... **Error!**

**Bookmark not defined.**

شکل ۱۲-۴: آنالیز فیلوژنیکی توالی های گونه های قارچی با استفاده از نرم افزار Mega. .... **Error!**

**Bookmark not defined.**

شکل ۱۳-۴: درخت فیلوژنی بدست آمده بر اساس نتایج توالی یابی. ایزوله های ۱۷، ۲۹، ۳۱، ۳۲، ۴۰، ۴۲، ۵۱

و ۵۲ مربوط به جنس کاندیدا و ایزوله ۵۶ مربوط به جنس اسپرژیلوس .... **Error! Bookmark not defined.**

## فهرست پیوست ها

صفحه

عنوان

پیوست شماره یک: چک لیست جمع آوری اطلاعات بیماران ..... **Error! Bookmark not defined.**

پیوست شماره دو: پرسشنامه طرح تحقیقاتی تحت عنوان: ..... **Error! Bookmark not defined.**

پیوست شماره سه: برگه اطلاعات ایمنی (MSDS) اتانول: ..... **Error! Bookmark not defined.**

## فهرست کوتاه نوشته‌ها

### ABBREVIATIONS

**BLAST** Basic Local Alignment Search Tool

**DNA** Deoxyribonucleic acid

**RNA** Ribosomal ribonucleic acid

**NCBI** National Center for Biotechnology Information

**PCR** Polymerase Chain Reaction

**TBE** Tris-borate-EDTA

**WHO** World Health Organization

**Gel Doc** Gel documentation system

## چکیده

**مقدمه:** شیوع قارچ‌های فرصت طلب طی سالهای اخیر بطور چشمگیری افزایش یافته است بطوریکه این ارگانیسم‌ها در بیماران مبتلا به ضعف سیستم ایمنی و برخی بیماریهای زمینه‌ای، افراد واجد سابقه بیماری در گذشته و مصرف کنندگان آنتی بیوتیک به مدت طولانی، پاتوژن بالقوه می‌باشند. از این رو احتمال می‌رود میزان بروز عفونتهای قارچی فرصت طلب در افراد مسلول بالا باشد و مطالعه حاضر در همین راستا و به منظور شناسایی عناصر قارچی با روش‌های مورفولوژیک و مولکولی در نمونه‌های خلط بیماران مسلول برنامه‌ریزی شده است.

**روش کار:** جمعیت مورد مطالعه در این طرح از بیماران مسلول مراجعه کننده به آزمایشگاه مرجع سل دانشگاه علوم پزشکی زاهدان در سال ۱۳۹۷ انتخاب شد. از هر نمونه خلط افراد مذکور، بخشی بصورت استریل بر روی محیط سابوردکستروز آگار محتوی کلرامفنیکل کشت داده شد و بخشی بطور مستقیم با استفاده از روشهای رنگ آمیزی مورد بررسی میکروسکوپی قرار گرفت. در کنار مشاهده مستقیم و کشت قارچی نمونه‌ها، آزمایشات مولکولی به روش Nested-PCR و تعیین توالی نوکلئوتیدی صورت پذیرفت.

**نتایج:** با استفاده از کشت نمونه‌ها در محیط کشت سابوردکستروز آگار حاوی کلرامفنیکل تعداد موارد مثبت (۱۹ از ۱۰۰) ۱۹% بود که از میان این تعداد (۱۲ از ۱۹) ۶۳/۱۵% در محیط کشت کروم آگار مثبت بودند که از این تعداد ۶ مورد کاندیدا آلبیکنس، ۲ مورد کاندیدا تروپیکالیس، ۱ مورد کاندیدا گلابراتا و ۳ مورد کاندیدا دابلینینسیس مشاهده گردید. در محیط کشت چاپک داکس آگار تعداد (۲ از ۱۹) ۱۰/۵% رشد مشاهده شد که با استفاده از کلید تشخیصی بارنت و هانتز، ۱ مورد اسپرژیلوس نیجر و یک مورد فلاووس تشخیص داده شد و تعداد ۵ مورد در محیط‌های کروم آگار و چاپک داکس آگار پس از دوبار تکرار رشد نمودند. در مرحله بعدی با استفاده از روش تشخیصی Nested-PCR تعداد موارد مثبت در مرحله اول PCR با استفاده از پرایمرهای Pan Fungal (۹ از ۱۰۰) ۹% بود که از میان این تعداد (۴ از ۹) ۴% در مرحله دوم PCR با استفاده از پرایمرهای اختصاصی کاندیدا آلبیکنس مثبت بودند و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی اسپرژیلوس فومیگاتوس موردی مشاهده نگردید. در روش تعیین توالی، توالی نوکلئوتیدی DNA نمونه‌ها با توالی‌های نوکلئوتیدی ثبت شده در بانک ژنی (NCBI) مورد مقایسه (Alignment) قرار گرفت و از ۹ مورد نمونه مثبت که

تعیین توالی مورد نوکلئوتیدی قرار گرفتند، ۴ مورد کاندیدا البیکنس، یک مورد کاندیدا تروپیکایس، یک مورد کاندیدا دابلیننسیس، دو مورد کاندیدا پاراپسیلوزیس و یک مورد آسپرژیلوس نیجر تشخیص داده شد. در مطالعه حاضر بیشترین عفونت قارچی شناسایی شده با استفاده از روش Nested-PCR در بیماران مسلول زن با ۷۷/۸ درصد (۷ از ۹ مورد مثبت) دیده شد که از نظر شغلی همگی خانه دار بودند و از نظر محل سکونت ۵۵/۶ درصد افراد ساکن مناطق روستایی بودند (۵ از ۹ مورد مثبت).

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج حاصل از این پژوهش و بررسی و مقایسه با تحقیقات مشابه در جوامع مختلف می توان چنین نتیجه گرفت که عناصر قارچی فرصت طلب به عنوان عوامل عفونی مطرح در بیماران دارای مشکلات تنفسی به شمار رفته و از فراوانی نسبتاً بالایی برخوردار هستند: شناسایی به موقع و موثر این عوامل در بیماران مسلول کمکی شایان در تسریع و تکمیل روند درمان و بهبود این افراد می نماید. از سوی دیگر با بررسی نتایج حاصل از روشهای تشخیص قارچ شناسی مورفولوژیک، Nested-PCR و مقایسه آن با تعیین توالی نوکلئوتیدی می توان نتیجه گرفت که همخوانی و قرابت میان روشهای مذکور در تشخیص عفونتهای قارچی در بیماران مسلول از صحت بالایی برخوردار می باشد و روشهایی قابل اتکا در شناسایی عفونتهای قارچی بیماران مسلول می باشند.

**کلمات کلیدی:** واژه های کلیدی: بیماری سل، عفونت قارچی، کاندیدا، Nested-PCR، زاهدان.

# منابع



1. Aiello HayR.J., Topley and Wilsons,s Microbiology and microbial infection. volume 4 : Medical Mycology . Pages : 523–451, Arnold, UK 1998.
2. Novak E. Berek & Novak's gynecology : Lippincott Williams & Wilkins; 2007.
3. Zaini F MA, Emami M. Comprehensive Medical Mycology, Tehran University Press, Third Edition. 1388. [Persian].
4. Cunningham FG LK, Bloom SL, Houth CJ, Gilstrap LC, Wenstrom KD. Williams obstrics MC grow-Hill. 22 ed : Medical publishing division, New York; 2005.
5. Akpan A, Morgan R. Oral candidiasis. Postgraduate medical journal. 2002;78(922) :455–9.
6. Jahromi SB, Khaksar AA. FUNGAL ISOLATES OF THE RESPIRATORY TRACT: 460. Critical Care Medicine. 2002;30(12):A111.
7. Naz SA, Tariq P. A study of the trend in prevalence of opportunistic Candidal coinfections among patients of pulmonary tuberculosis. Pak J Bot. 2004;36 :857–62.
8. Pashley CH, Fairs A, Morley JP, Tailor S, Agbetile J, Bafadhel M, et al. Routine processing procedures for isolating filamentous fungi from respiratory sputum samples may underestimate fungal prevalence. Medical mycology. 2012;50(4) :433–8.
9. Shailaja V, Pai L, Mathur D, Lakshmi V. Prevalence of bacterial and fungal agents causing lower respiratory tract infections in patients with human immunodeficiency virus infection. Indian Journal of Medical Microbiology. 2004;22(1) :28.
10. Fontalvo DM, Jiménez Borré G, Gómez Camargo D, Chalavé Jiménez N, Bellido Rodríguez J, Cuadrado Cano B, et al. Tuberculosis and fungal co-infection present in a previously healthy patient. Colombia Mé dica. 2016;47(2) :105–8.
11. Astekar M, Bhatiya PS, Sowmya G. Prevalence and characterization of opportunistic

candidal infections among patients with pulmonary tuberculosis. Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP. 2016;20(2):183.

12. Kollath DR, Miller KJ, Barker BM. The mysterious desert dwellers : *Coccidioides immitis* and *Coccidioides posadasii*, causative fungal agents of coccidioidomycosis. Virulence. 2019;10(1):222-33.

13. Puri SC, Verma V, Amna T, Qazi GN, Spiteller M. An endophytic fungus from *Nothapodytes foetida* that produces camptothecin. J Nat Prod. 2005;68(12):1717-9.

14. Groll A, Walsh T. Uncommon opportunistic fungi: new nosocomial threats. Clinical Microbiology and Infection. 2001;7:8-24.

15. Emmons C. Natural occurrence of opportunistic fungi. Laboratory Investigation. 1962;11(11, No. 2).

16. Saiman L, Ludington E, Dawson JD, Patterson JE, Rangel-Frausto S, Wiblin RT, et al. Risk factors for *Candida* species colonization of neonatal intensive care unit patients. The Pediatric infectious disease journal. 2001;20(12):1119-24.

17. Berkhout CM. De schimmelgeslachten *Monilia*. *Oidium*, *Oospora*, en *Torula*. 1923.

18. Eggimann P, Garbino J, Pittet D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. The Lancet infectious diseases. 2003;3(11):685-702.

19. Calderone RA, Clancy CJ. *Candida* and candidiasis: American Society for Microbiology Press; 2011.

20. Diezmann S, Cox CJ, Schönián G, Vilgalys RJ, Mitchell TG. Phylogeny and evolution of medical species of *Candida* and related taxa: a multigenic analysis. Journal of clinical microbiology. 2004;42(12):5624-35.

21. Rippon JW. Medical mycology; the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes : Eastbourne, UK; WB Saunders Company; 1982.
22. Charles PE, Dalle F, Aube H, Doise JM, Quenot JP, Aho LS, et al. Candida spp. colonization significance in critically ill medical patients : a prospective study. Intensive care medicine. 2005;31(3):393-400.
23. Ajello L, Hay RJ. Topley & Wilson's microbiology and microbial infections. Volume 4 : Medical mycology : Arnold, Hodder Headline; 1998.
24. Sendid B, François N, Standaert A, Dehecq E, Zerimech F, Camus D, et al. Prospective evaluation of the new chromogenic medium CandiSelect 4 for differentiation and presumptive identification of the major pathogenic Candida species. Journal of medical microbiology. 2007;56(4):495-9.
25. Yücesoy M, Marol S. Performance of CHROMAGAR candida and BIGGY agar for identification of yeast species. Annals of clinical microbiology and antimicrobials. 2003;2(1):1.
26. Kauffman CA, Pappas PG, Sobel JD, Dismukes WE. Essentials of clinical mycology : Springer; 2011.
27. Hospenthal DR, Rinaldi MG. Diagnosis and treatment of human mycoses : Springer Science & Business Media; 2007.
28. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm : a fungal perspective. Current opinion in microbiology. 2006;9(6):588-94.
29. Kumamoto CA. Candida biofilms. Current opinion in microbiology. 2002;5(6):608-11.
30. Nett J, Andes D. Candida albicans biofilm development, modeling a host-pathogen interaction. Current opinion in microbiology. 2006;9(4):340-5.

31. Ghannoum MA. Potential role of phospholipases in virulence and fungal pathogenesis. *Clinical microbiology reviews*. 2000;13(1):122-43.
32. Naglik JR, Rodgers CA, Shirlaw PJ, Dobbie JL, Fernandes-Naglik LL, Greenspan D, et al. Differential expression of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinase and phospholipase B genes in humans correlates with active oral and vaginal infections. *Journal of Infectious Diseases*. 2003;188(3):469-79.
33. Noumi E, Snoussi M, Hentati H, Mahdouani K, del Castillo L, Valentin E, et al. Adhesive properties and hydrolytic enzymes of oral *Candida albicans* strains. *Mycopathologia*. 2010;169(4):269-78.
34. Yike I. Fungal proteases and their pathophysiological effects. *Mycopathologia*. 2011;171(5):299-323.
35. Schaller M, Borelli C, Korting HC, Hube B. Hydrolytic enzymes as virulence factors of *Candida albicans*. *Mycoses*. 2005;48(6):365-77.
36. Calderone RA, Fonzi WA. Virulence factors of *Candida albicans*. *Trends in microbiology*. 2001;9(7):327-35.
37. Luo G, Samaranayake L, Cheung B, Tang G. Reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) detection of HLP gene expression in *Candida glabrata* and its possible role in in vitro haemolysin production. *Apmis*. 2004;112(4-5):283-90.
38. Tsang C, Chu F, Leung W, Jin L, Samaranayake L, Siu S. Phospholipase, proteinase and haemolytic activities of *Candida albicans* isolated from oral cavities of patients with type 2 diabetes mellitus. *Journal of medical microbiology*. 2007;56(10):1393-8.
39. Manns JM, Mosser DM, Buckley HR. Production of a hemolytic factor by *Candida albicans*.

Infection and immunity. 1994;62(11):5154-6.

40. Luo G, Samaranayake LP, Yau JY. Candida species exhibit differential in vitro hemolytic activities. Journal of clinical microbiology. 2001;39(8):2971-4.

41. Palomo JM, Ortiz C, Fuentes M, Fernandez-Lorente G, Guisan JM, Fernandez-Lafuente R. Use of immobilized lipases for lipase purification via specific lipase-lipase interactions. Journal of Chromatography A. 2004;1038(1):267-73.

42. De Maria PD, Sánchez-Montero JM, Sinisterra JV, Alcántara AR. Understanding Candida rugosa lipases: an overview. Biotechnology advances. 2006;24(2):180-96.

43. Beisson F, Tiss A, Riviere C, Verger R. Methods for lipase detection and assay: a critical review. European Journal of Lipid Science and Technology. 2000;102(2):133-53.

44. Rodrigues AG, Pina-Vaz C, Costa-de-Oliveira S, Tavares C. Expression of plasma coagulase among pathogenic Candida species. Journal of clinical microbiology. 2003;41(12):5792-3.

45. Soll DR, Morrow B, Srikantha T. High-frequency phenotypic switching in Candida albicans. Trends in genetics. 1993;9(2):61-5.

46. McCullough M, Ross B, Reade P. Candida albicans: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. International journal of oral and maxillofacial surgery. 1996;25(2):136-44.

47. Wingard JR. Importance of Candida species other than C. albicans as pathogens in oncology patients. Clinical infectious diseases. 1995;20(1):115-25.

48. Wingard JR, Merz WG, Rinaldi MG, Johnson TR, Karp JE, Saral R. Increase in Candida krusei infection among patients with bone marrow transplantation and neutropenia treated prophylactically with fluconazole. New England Journal of Medicine. 1991;325(18):1274-7.

49. Yagupsky P, Nolte F, Menegus M. Enhanced detection of *Candida* in blood cultures with the BACTEC 460 system by use of the aerobic-hypertonic (8B) medium. *Epidemiology and infection*. 1990;105(03):553-8.

۵۰. زینی ف، مهبد سع، امامی م. قارچ شناسی پزشکی جامع. ویرایش ۴، تهران: دانشگاه تهران؛

۱۳۹۲.

51. Fidel PL, Vazquez JA, Sobel JD. *Candida glabrata*: review of epidemiology, pathogenesis, and clinical disease with comparison to *C. albicans*. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(1):80-96.

52. Reuter CW, Morgan MA, Bange F-C, Gunzer F, Eder M, Hertenstein B, et al. *Candida kefyr* as an emerging pathogen causing nosocomial bloodstream infections in neutropenic leukemia patients. *Clinical infectious diseases*. 2005;41(9):1365-6.

53. Sendid B, Lacroix C, Bougnoux M-E. Is *Candida kefyr* an emerging pathogen in patients with oncohematological diseases? *Clinical infectious diseases*. 2006;43(5):666-7.

54. Gonzalez IL, Chambers C, Gorski JL, Stambolian D, Schmickel RD, Sylvester JE. Sequence and structure correlation of human ribosomal transcribed spacers. *Journal of molecular biology*. 1990;212(1):27-35.

55. Merz W. *Candida lusitanae*: frequency of recovery, colonization, infection, and amphotericin B resistance. *Journal of Clinical Microbiology*. 1984;20(6):1194-5.

56. Pfaller M, Diekema D, Mendez M, Kibbler C, Erzsebet P, Chang S-C, et al. *Candida guilliermondii*, an opportunistic fungal pathogen with decreased susceptibility to fluconazole: geographic and temporal trends from the ARTEMIS DISK antifungal surveillance program. *Journal of clinical microbiology*. 2006;44(10):3551-6.

57. Kontoyiannis D, Reddy B, Torres H, Luna M, Lewis R, Tarrand J, et al. Pulmonary candidiasis in patients with cancer: an autopsy study. *Clinical infectious diseases*. 2002;34(3):400-3.
58. Rose HD, Sheth NK. Pulmonary candidiasis : a clinical and pathological correlation. *Archives of internal medicine*. 1978;138(6):964-5.
59. Franquet T, Muller NL, Lee KS, Oikonomou A, Flint JD. Pulmonary candidiasis after hematopoietic stem cell transplantation : thin-section CT findings. *Radiology*. 2005;236(1):332-7.
60. Kassner E, Kauffman S, Yoon J, Semiglia M, Kozinn P, Goldberg P. Pulmonary candidiasis in infants : clinical, radiologic, and pathologic features. *American Journal of Roentgenology*. 1981;137(4):707-16.
61. Masur H, Rosen PP, Armstrong D. Pulmonary disease caused by *Candida* species. *The American journal of medicine*. 1977;63(6):914-25.
62. Raper KB, Fennell DI. The genus *Aspergillus*. *The genus Aspergillus*. 1965.
63. Abbott J. Clinical and microscopic diagnosis of vaginal yeast infection: a prospective analysis. *Annals of emergency medicine*. 1995;25(5):587-91.
64. Collee J. Mackie and McCartney practical medical microbiology. 1989.
65. Kreger D. Observations on cell walls of yeasts and some other fungi by X-ray diffraction and solubility tests. *Biochimica et biophysica acta*. 1954;13:1-9.
66. Neppelenbroek K, Campanha N, Spolidório DMP, Spolidorio LC, Seó R, Pavarina AC. Molecular fingerprinting methods for the discrimination between *C. albicans* and *C. dubliniensis*. *Oral diseases*. 2006;12(3):242-53.

67. Guthrie C, Fink GR. Guide to yeast genetics and molecular and cell Biology : Part C : Gulf Professional Publishing; 2002.
68. Fredricks DN, Smith C, Meier A. Comparison of six DNA extraction methods for recovery of fungal DNA as assessed by quantitative PCR. *Journal of clinical microbiology*. 2005;43(10):5122-8.
69. Atkins SD, Clark IM. Fungal molecular diagnostics: a mini review. *J Appl Genet*. 2004;45(1):3-15.
70. Schena L, Nigro F, Ippolito A, Gallitelli D. Real-time quantitative PCR : a new technology to detect and study phytopathogenic and antagonistic fungi. *European journal of plant pathology*. 2004;110(9):893-908.
71. Olsvik Ø, Wahlberg J, Petterson B, Uhlen M, Popovic T, Wachsmuth I, et al. Use of automated sequencing of polymerase chain reaction-generated amplicons to identify three types of cholera toxin subunit B in *Vibrio cholerae* O1 strains. *Journal of Clinical Microbiology*. 1993;31(1):22-5.
72. Fiers W, Contreras R, Duerinck F, Haegeman G, Iserentant D, Merregaert J, et al. Complete nucleotide sequence of bacteriophage MS2 RNA: primary and secondary structure of the replicase gene. *Nature*. 1976;260(5551):500-7.
73. Jou WM, Haegeman G, Ysebaert M, Fiers W. Nucleotide sequence of the gene coding for the bacteriophage MS2 coat protein. *Nature*. 1972;237:82-8.
74. Pettersson E, Lundeberg J, Ahmadian A. Generations of sequencing technologies. *Genomics*. 2009;93(2):105-11.
75. Maxam AM, Gilbert W. A new method for sequencing DNA. *Proceedings of the National*



Academy of Sciences. 1977;74(2):560-4.

76. Sanger F, Coulson AR. A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology*. 1975;94(3):441-8.

77. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1977;74(12):5463-7.

78. Förster H, Coffey MD, Elwood H, Sogin ML. Sequence analysis of the small subunit ribosomal RNAs of three zoosporic fungi and implications for fungal evolution. *Mycologia*. 1990:306-12.

79. Haridas S, Breuill C, Bohlmann J, Hsiang T. A biologist's guide to de novo genome assembly using next-generation sequence data: a test with fungal genomes. *Journal of microbiological methods*. 2011;86(3):368-75.

80. Hope W, Walsh T, Denning D. Laboratory diagnosis of invasive aspergillosis. *The Lancet infectious diseases*. 2005;5(10):609-22.

81. Latgé J-P. *Aspergillus fumigatus* and aspergillosis. *Clinical microbiology reviews*. 1999;12(2):310-50.

82. Pontecorvo G, Roper J, Chemmons L, MacDonald K, Bufton A. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Advances in genetics*. 5: Elsevier; 1953. p. 141-238.

83. Yelton MM, Hamer JE, Timberlake WE. Transformation of *Aspergillus nidulans* by using a *trpC* plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1984;81(5):1470-4.

84. White DA. *Aspergillus* pulmonary infections in transplant recipients. *Clinics in chest medicine*. 2005;26(4):661-74, vii.

85. Hedayati MT, Khodavaisy S, Alialy M, Omran SM, Habibi MR. Invasive aspergillosis in

intensive care unit patients in Iran. *Acta medica*. 2013;56(2):52-6.

86. Ansorg R, van den Boom R, Rath PM. Detection of *Aspergillus* galactomannan antigen in foods and antibiotics. *Mycoses*. 1997;40(9-10):353-7.

87. Roudbarmohammadi Sh, Salimi-Khorashad A, Forouzandeh-Moghadam M, Roudbary M. Investigating the Presence of *Aspergillus fumigatus* and *A. flavus* Using Galactomannan Enzyme Assay and TaqMan Real-Time PCR Technique. *Jundishapur J Microbiol*, 2018, doi: 10.5812/jjm.13670.

88. Monis PT, Andrews RH. Molecular epidemiology: assumptions and limitations of commonly applied methods. *International journal for parasitology*. 1998;28(6):981-7.

89. Mahmoud MA. Detection of *Aspergillus flavus* in stored peanuts using real-time PCR and the expression of aflatoxin genes in toxigenic and atoxigenic *A. flavus* isolates. *Foodborne pathogens and disease*. 2015;12(4):289-96.

90. Parida M, Sannarangaiah S, Dash PK, Rao PV, Morita K. Loop mediated isothermal amplification (LAMP): a new generation of innovative gene amplification technique; perspectives in clinical diagnosis of infectious diseases. *Reviews in medical virology*. 2008;18(6):407-21.

91. Johnson DC. Chronic candidal bronchitis: a consecutive series. *Open Respir Med J*. 2012;6:145-9.

92. Kali A, Charles MP, Noyal MJ, Sivaraman U, Kumar S, Easow JM. Prevalence of *Candida* co-infection in patients with pulmonary tuberculosis. *Australas Med J*. 2013;6(8):387-91.

93. Mwaura EN, Matiru V, Bii C. Mycological Findings of Sputum Samples from Pulmonary Tuberculosis Patients Attending TB Clinic in Nairobi, Kenya. *Virol Mycol*. 2013;2(3).

94. Babita, Suman S, Kumar P. Prevalence of Mycotic Flora with Pulmonary Tuberculosis Patient in a Tertiary Care Hospital. *International Journal of Contemporary Medical Research*. 2016;3(9).
95. J Mowna, Kaliyamoorthi D. Mycological spectrum in Sputum samples of Pulmonary Tuberculosis Attending TB Clinic. *International Journal of Multidisciplinary Research and Development* 2015;2(2): 487-90.
96. Kalyani CS, Koripella RL, Madhu C. Fungal Isolates in Sputum Samples of Multidrug-resistant Tuberculosis Suspects. *International journal of scientific study*. 2016;4(2):164-6.
97. Jabbari Amiri MR, Aghili SR, Shokohi T, Hedayati MT, Abastabar M, Aliyali M, et al. Invasive forms of *Candida* and *Aspergillus* in sputum samples of pulmonary tuberculosis patients attending the tuberculosis reference laboratory in Ghaemshahr, Northern Iran: An analysis of samples collected during the past 10years. *Int J Mycobacteriol*. 2016;5 Suppl 1 :S179-S80.
98. Astekar M, Bhatiya PS, Sowmya GV. Prevalence and characterization of opportunistic candidal infections among patients with pulmonary tuberculosis. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2016;20(2):183-9.
99. Sampath A, Weerasekera M, Gunasekara C, Dilhari A, Bulugahapitiya U, Fernando N. A sensitive and a rapid multiplex polymerase chain reaction for the identification of *Candida* species in concentrated oral rinse specimens in patients with diabetes. *Acta Odontol Scand*. 2017;75(2):113-22.
100. Nieto M, Robles JC, Causse M, Gutierrez L, Cruz Perez M, Ferrer R, et al. Polymerase Chain Reaction Versus Blood Culture to Detect *Candida* Species in High-Risk Patients with Suspected Invasive Candidiasis: The MICAFEM Study. *Infect Dis Ther*. 2019.

۱۰۱. اسکندری ا, مصباح نمین ع, یادگاری م ح. استفاده از روش PCR در شناسایی گونه های مهم بیماری زای کاندیدیایی در مبتلایان به کاندیدیازیس حاد.

102. Bineshian F, Yadegari MH; Sharifi Z ; Akbari Eidgahi MR ; Nasr R. Identification of Candida Species Using MP65 Gene and Evaluation of the Candida albicans MP65 Gene Expression in BALB/C Mice. Jundishapur J Microbiol. 2015.

103. Mohammadi R, Mirhendi H, Yadegari MH, Shadzi S, Jalalizand N, Identification and Frequency of Candida Species in Patients with Different Forms of Candidiasis in Isfahan, Using PCR-RFLP Method . Journal of Isfahan Medical School. 2011 : Vol 29, No 133

104. FATAHI M, SHOKOUHI T, HASHEMI SS, Hedayati M, Okhovatian A, Tamadoni A, et al. Molecular identification of Candida albicans isolated from the oncology patients at four university hospitals in Mazandaran province (2005-6). 2008.

105. Leaw SN, Chang HC, Sun HF, Barton R, Bouchara J-P, Chang TC. Identification of medically important yeast species by sequence analysis of the internal transcribed spacer regions. Journal of Clinical Microbiology. 2006;44(3):693-9.

106. Duggal R, Rajwanshi A, Gupta N, Lal A, Singhal M. Polymicrobial lung infection in postrenal transplant recipient diagnosed by fine-needle aspiration cytology. Diagn Cytopathol. 2010;38(4):294-6.

107. Khanna B, Nath P, Ansari A. A study of mycotic flora of respiratory tract in pulmonary tuberculosis. 1977.

108. Santiwongkarn P, Kachonboon S, Thanyasrisung P, Matangkasombut O. Prevalence of oral Candida carriage in Thai adolescents. Journal of investigative and clinical dentistry. 2012;3(1):51-5.

109. Samson RA, Houbraken J, Kuijpers AF, Frank JM, Frisvad JC. New ochratoxin A or sclerotium producing species in *Aspergillus* section *Nigri*. *Studies in mycology*. 2004;50(1):45–56.
110. Fraser VJ, Jones M, Dunkel J, Storfer S, Medoff G, Dunagan WC. Candidemia in a tertiary care hospital: epidemiology, risk factors, and predictors of mortality. *Clinical Infectious Diseases*. 1992;15(3):414–21.
111. Mardh PA, Novikova N, Stukalova E. Colonisation of extragenital sites by *Candida* in women with recurrent vulvovaginal candidosis. *Bjog*. 2003;110(10):934–7.
112. Mwaura E, Matiru V, Bii C. Mycological Findings of Sputum Samples from Pulmonary Tuberculosis Patients Attending TB Clinic in Nairobi, Kenya. *Viol Mycol* 2: 119. doi: 10.4172/2161-0517.1000119 Page 2 of 6 threatening diseases [12]. *Candida*; 2013.
113. Bao F, Fan Y, Sun L, Yu Y, Wang Z, Pan Q, et al. Comparison of fungal fluorescent staining and ITS rDNA PCR-based sequencing with conventional methods for the diagnosis of onychomycosis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. 2018;32(6):1017–21.
114. Amichai B, Davidovici B, Trau H, Lyakhovitsky A, Grunwald M, Shemer A. A rationale for systemic treatment in onychomycosis with negative results on fungal examination. *Clinical and Experimental Dermatology: Clinical dermatology*. 2011;36(7):724–7.
115. Paugam A, L'ollivier C, Viguié C, Anaya L, Mary C, De Ponfilly G, et al. Comparison of real-time PCR with conventional methods to detect dermatophytes in samples from patients with suspected dermatophytosis. *Journal of microbiological methods*. 2013;95(2):218–22.
116. Bonifaz A, Rios-Yuil JM, Arenas R, Araiza J, Fernandez R, Mercadillo-Perez P, et al.

Comparison of direct microscopy, culture and calcofluor white for the diagnosis of onychomycosis. *Rev Iberoam Micol.* 2013;30(2):109-11.

117. Haldane DJ, Robart E. A comparison of calcofluor white, potassium hydroxide, and culture for the laboratory diagnosis of superficial fungal infection. *Diagn Microbiol Infect Dis.* 1990;13(4):337-9.

118. Petinataud D, Berger S, Ferdynus C, Debourgogne A, Contet-Audonneau N, Machouart M. Optimising the diagnostic strategy for onychomycosis from sample collection to FUNGAL identification evaluation of a diagnostic kit for real-time PCR. *Mycoses.* 2016;59(5):304-11.

119. Weinberg JM, Koestenblatt EK, Tutrone WD, Tishler HR, Najarian L. Comparison of diagnostic methods in the evaluation of onychomycosis. *Journal of the American Academy of Dermatology.* 2003;49(2):193-7.

120. Selvarangan R, Bui U, Limaye AP, Cookson BT. Rapid identification of commonly encountered *Candida* species directly from blood culture bottles. *J Clin Microbiol.* 2003;41(12):5660-4.

121. Pfaller MA, Houston A, Coffmann S. Application of CHROMagar *Candida* for rapid screening of clinical specimens for *Candida albicans*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, and *Candida (Torulopsis) glabrata*. *Journal of clinical microbiology.* 1996;34(1):58-61.

۱۲۲. میرهندی ح، کوئیچی مم، شیدفرم ر، حسین پور ل. شناسایی و تعیین فراوانی گونه های کاندیدا جدا شده از بیماران به روش کروم آگار کاندیدا.

123. Berrouane YF, Herwaldt LA, Pfaller MA. Trends in antifungal use and epidemiology of nosocomial yeast infections in a university hospital. *Journal of Clinical Microbiology.* 1999;37(3):531-7.

124. Geiser DM. Sexual structures in *Aspergillus*: morphology, importance and genomics. *Medical mycology*. 2009;47(sup1):S21-S6.
125. Ochieng W, Wanzala P, Bii C, Oishi I, Ichimura H, Lihana R, et al. Tuberculosis and oral *Candida* species surveillance in HIV infected individuals in Northern Kenya, and the implications on tuberculin skin test screening for DOPT-P. *East African medical journal*. 2005;82(12):609-13.
126. Franquet T, Müller NL, Oikonomou A, Flint JD. *Aspergillus* infection of the airways: computed tomography and pathologic findings. *Journal of computer assisted tomography*. 2004;28(1):10-6.
127. Kawamura S, Maesaki S, Tomono K, Tashiro T, Kohno S. Clinical evaluation of 61 patients with pulmonary aspergilloma. *Internal medicine*. 2000;39(3):209-12.
128. Denning DW, Pleuvry A, Cole DC. Global burden of chronic pulmonary aspergillosis as a sequel to pulmonary tuberculosis. *Bulletin of the World Health Organization*. 2011;89:864-72.

## Abstract

**Background:** The prevalence of opportunistic fungi has increased dramatically in recent years, so that these organisms are potentially pathogenic in patients with weakened immune systems and some underlying diseases, people with a history of disease in the past, and long-term antibiotic users. Therefore, it is likely that the incidence of opportunistic fungal infections in tubercular people is high. The present study is planned to identify fungal elements by morphological and molecular methods in sputum samples of tubercular patients.

**Methods:** The study population selected from tubercular patients referred to Tuberculosis Reference Laboratory at Zahedan University of Medical Sciences in 2018. From each specimen, one portion was cultured in a sterile conditions on Sabour's dextrose agar containing chloramphenicol and the other part was directly examined microscopically using staining methods. In addition to direct observation and fungal culture of the samples, molecular tests were carried out by Nested-PCR and nucleotide sequencing.

**Results:** By growing specimens in Sabouraud Dextrose Agar medium containing chloramphenicol, 19% of the cases (19 of 100) were positive, out of which 63.15% (12 of 19) were positive in the *CHROMagar* medium. Of these, 6 cases of *Candida albicans*, 2 cases of *Candida tropicalis*, 1 case of *Candida glabrata* and 3 cases of *Candida dubliniensis* were observed. In the *Czapek dox Agar medium*, 10.5% (2 of 19) growth was observed, then using Barent and Hunter diagnostic key, 1 case of *Aspergillus Niger* and one case of *Aspergillus flavus* was diagnosed. And 5 cases did not grow in *CHROMagar* and *Czapekdox agar medium* after twice repeating. In the next step, by applying the Nested-PCR diagnostic method, the number of positive cases in the first stage of PCR using Pan Fungal primers (9 out of 100) was 9%. Of these,



4% (4 of 9) were positive in the second stage of PCR using *Candida albicans* specific primers and no specific cases were detected using *Aspergillus fumigatus* specific primers. In the sequencing method, the DNA nucleotide sequences of the samples were compared (Alignment) with the nucleotide sequences registered in the GenBank (NCBI). Of the 9 positive sequencing cases, 4 were identified as *Candida albicans*, 1 as *Candida tropicalis*, 1 as *Candida dubliniensis*, 2 as *Candida parapsilosis* and 1 *Aspergillus Niger*. In the present study, the most fungal infection that identified using Nested-PCR method was observed in female tubercular patients with 8.77% (7 out of 9 positive cases), all of whom were housewives and 6.55% of them were residents in rural areas (5 out of 9 positive cases).

**Conclusion:** Based on the results of this study, comparing and reviewing similar research in different societies, it can be concluded that opportunistic fungal elements are among the infectious agents in patients with respiratory problems and they are relatively abundant. Timely and effective identification of these factors in tuberculosis patients can be helpful in accelerating and completing the process of treatment and recovery of these people. On the other hand, by examining the results of mycological and Nested-PCR diagnostic methods and comparing it with nucleotide sequencing, it can be concluded that the compatibility and similarity between these methods in the diagnosis of fungal infections in tuberculosis patients has a high level of accuracy. They are also one of the reliable methods for identifying fungal infections of tuberculosis patients.

**Keywords :** Tuberculosis, Fungal Infections, *Candida*, Nested-PCR, Zahedan



**KERMAN UNIVERSITY  
OF MEDICAL SCIENCES**

**Faculty of Medicine**

In Partial Fulfillment of the Requirements for the Master Degree

Title

**Detection of Fungal Elements Using Morphological and Molecular Methods in  
Sputum Samples of Tuberculous Patients Referred To the Tuberculosis  
Reference Laboratory of Sistan and Baluchestan Province In 2019**

By

**Hamid Reza Ebrahimifar**

Supervisors

**1-Seyyed Amin Ayatollahi Mousavi (Ph.D)|2-Alireza Salimi Khorashad  
(Ph.D)**

Advisor

**1-Alireza Dashipour (Ph.D)**

Thesis No: **(561)**

Date **(May, 2020)**